

高温胁迫对不同热敏型辣椒同工酶 及 DNA 甲基化的影响

胡能兵, 隋益虎, 舒英杰, 何克勤

(安徽科技学院 农学院, 安徽凤阳 233100)

摘要: 分别以耐热型晚熟紫色辣椒‘7036’和热敏型早熟绿色辣椒‘9050’为材料, 研究了 40℃ 高温胁迫对其 POD 同工酶以及 DNA 甲基化表达的影响。结果显示: (1) 在 POD 同工酶表达方面, 未经高温胁迫的辣椒‘7036’比其它处理多出 1 条带, 而同工酶活性在 2 种辣椒中呈现不同的变化趋势。 (2) 随着高温胁迫时间延长, 辣椒‘7036’DNA 无甲基化和全甲基化比率增加, 半甲基化和总甲基化比率降低, 而辣椒‘9050’只有高温处理 7 d (T_7) 的甲基化水平变化与之类似, 但半甲基化和全甲基化比率的绝对值远低于辣椒‘7036’。 (3) 高温处理 7 d 的 DNA 甲基化模式中, 辣椒‘7036’去甲基化 C 型条带比率较高, 辣椒‘9050’以超甲基化 B 型条带为主。实验表明, 高温胁迫下紫色辣椒‘7036’的 POD 同工酶活性恢复, 半甲基化水平大幅下降和全甲基化水平快速上升以及去甲基化等变化可能与其耐高温胁迫特性相关。

关键词: 辣椒; 高温胁迫; POD 同工酶; DNA 甲基化; 去甲基化

中图分类号: Q945. 78

文献标志码: A

Effect of Heat Stress on Isoenzyme and DNA Methylation of Different Heat-sensitive Peppers

HU Nengbing, SUI Yihu, SHU Yingjie, HE Keqin

(College of Agriculture, Anhui Science and Technology University, Fengyang, Anhui 233100, China)

Abstract: By using heat-resisting, late-maturing purple pepper ‘7036’ and heat-sensitive, early-maturing green pepper ‘9050’, we studied the effects of heat stress on POD isozyme and DNA methylation expression. The results indicated that: (1) as for POD expression, one more band existed in treatment without heat stress in pepper ‘7036’, and different change tendency of POD activity existed in two peppers. (2) With the time extending, percentage of non-methylation and full-methylation increased, whereas percentage of half methylation and total methylation decreased in pepper ‘7036’, and only percentage of methylation in the treatment of heat stress for 7 days (T_7) showed similar changing tendency in pepper ‘9050’, while its absolute values of full-methylation and half methylation ratio were significantly less than those of ‘7036’. (3) As regards to methylation profiles of T_7 treatment, higher ratio of C type band of hypomethylation existed in pepper ‘7036’ and B type band of hypermethylation showed in pepper ‘9050’. The results above showed that, recovery of POD activity, declining in percentage of half methylation and rising in percentage of full-methylation rapidly, and hypomethylation were relevant to resisting heat stress in purple pepper ‘7036’.

Key words: pepper; heat stress; POD isozyme; DNA methylation; hypomethylation

收稿日期: 2015-10-20; 修改稿收到日期: 2015-12-15

基金项目: 安徽省教育厅重点项目 (KJ2014A057); 安徽科技学院自然科学项目 (ZRC2013374); 安徽科技学院第十二批大学生创新基金

作者简介: 胡能兵 (1980-), 男, 博士, 副教授, 主要从事园艺植物组织培养及育种工作。E-mail: hunengbing@126.com

高温是植物生长发育过程中最常见的环境胁迫因子之一,严重影响植物正常生长、产量以及品质等^[1]。特别是随着全球性温室效应的持续加剧,严重高温逆境给全球种植业带来挑战^[2]。以中国为例,夏秋之际的高温会严重影响全国绝大部分地区的蔬菜生产和供应,导致蔬菜产量急剧下降,价格不断攀升。

茄科植物是中国的主要蔬菜作物,尤以辣椒最受喜爱。辣椒原产南美洲地区,是一种喜温怕热的蔬菜^[3]。辣椒生长的适宜温度为 20~30 °C,超过 32 °C 就会发生高温胁迫^[4]。邹学校研究表明,在 40 °C 高温处理下,辣椒的发芽率、发芽势、发芽指数以及生长速率均有所下降,但品种间存在差异,表现为热敏品种降幅更大^[5];Pagamas 等研究表明,耐热品种在不同温度处理下,其株高、根长、茎粗等降幅小于热敏品种^[6];此外,热胁迫主要导致辣椒‘三落’(落叶、落花、落果)而影响产量,超过 30 °C 高温会使辣椒座果率降至 10%~20%^[5]。

目前,研究者已对辣椒的耐热性开展了相关的应用及基础研究^[4,7-10]。此外,安徽科技学院辣椒课题组以当地的紫色辣椒为材料,在育种方面做了有益的工作,即紫色辣椒自交或作为母本用于杂交的座果率要极显著高于绿色品种^[11]。结合本课题组以及前人在紫色辣椒的研究成果,说明紫色辣椒具有耐高温强光的特性,明确其在抗性和品质育种方面的巨大潜能^[12-13]。然而,迄今为止尚未有从分子水平探索紫色辣椒耐高温的机制。

本实验以耐热型晚熟紫色辣椒‘7036’和热敏型早熟绿色辣椒‘9050’为材料,以 40 °C 为高温胁迫条件,在该条件下分别对上述不同热敏型辣椒进行不同时间的处理,通过比较‘7036’和‘9050’在同工酶、甲基化水平和模式的变化,明确紫色辣椒适应高温胁迫的生理生化机理,为后续克隆与高温胁迫相关的序列片段、进而发掘耐高温胁迫的关键基因奠定

基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

耐热型晚熟紫色辣椒‘7036’和热敏型早熟绿色辣椒‘9050’分别由安徽科技学院辣椒课题组多年选育、纯化而成。其中,紫色辣椒‘7036’开花结果期叶片、茎秆呈浓紫色,果实在整个生育期会经历紫、绿相间-紫色-紫、红相间、红色等 4 个过程,具体见相关文献^[12]。

1.2 高温胁迫处理

2014 年 11 月初在温室内播种育苗,待辣椒长至 6 叶 1 心期,将幼苗移至育苗基质中炼苗 10 d 左右。置于恒温培养箱中,每天 40 °C 处理 3 h,分别于处理第 0、1、3、5、7 天取整株叶片,取样时间为处理后 2 h,每个样品随机取 3 株,分别标记为 CK、T₁、T₃、T₅、T₇。一部分叶片用于 POD 同工酶提取,其余叶片则置于 -20 °C 条件下保存,用于后续 DNA 提取。

1.3 POD 同工酶检测

按照叶片重量:提取缓冲液体积(0.065 mol/L Tris-柠檬酸,pH 8.2)=1:2 的比率在冰浴条件下研磨,10 000 r/min 转速 4 °C 离心 5 min,置于 -20 °C 条件下保存备用。浓缩胶和分离胶浓度分别为 4%和 7%。POD 电泳时间为 2.5 h,电泳完毕后,采用联苯胺法进行染色^[14]。

1.4 甲基敏感扩增多态性(MSAP)分析

DNA 提取采用改良 CTAB 法^[8]。提取的 DNA 分别经过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计法检测,各处理 DNA 调整为一致浓度后用于后续试验。MSAP 试验步骤等参照 Reyna-López 等^[15]方法,主要包括酶切、连接、预扩增和选择性扩增等 4 个步骤。MSAP 的接头和引物序列见表 1,所用双酶切组合为 *EcoR* I / *Hpa* II (*Msp* I),其中选择性扩增

表 1 接头和引物序列

Table 1 Sequence of adaptors and primers

接头/引物 Adaptor/primer	序列 Sequence	
	<i>EcoR</i> I (E)(5'→3')	<i>Hpa</i> II - <i>Msp</i> I (HM)(5'→3')
接头 Adaptor	CTCGTAGACTGCGTACC AATTGGTACGAGTC	GATCATGAGTCCTGCT CGAGCAGGACTCATGA
预扩增引物 Pre-amplification primer	GACTGCGTACCAATTCA(E0)	ATCATGAGTCCTGCTCGGT(H0)
选择性扩增引物 Selective amplification primer	GACTGCGTACCAATTCACA(E1) GACTGCGTACCAATTC AAC(E2) GACTGCGTACCAATTC AAG(E3) GACTGCGTACCAATTC ACT(E4) GACTGCGTACCAATTC ACG(E5) GACTGCGTACCAATTC ACC(E6)	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAA(H1) ATCATGAGTCCTGCTCGGTAC(H2) ATCATGAGTCCTGCTCGGTCC(H3) ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC(H4)

为 E1~E6 与 H1~H4 共 24 个引物随机组合。采用银染法染色^[16]。

1.5 数据统计

对双酶切后的条带数量和条带的类型进行统计与分析。其中,1 个酶切识别位点即为 1 条带,条带的有无分别用 1 和 0 来表示。

2 结果与分析

2.1 高温胁迫对 2 种辣椒 POD 同工酶表达的影响

POD 同工酶是一族能够利用 H_2O_2 氧化供氢体的酶,在高等植物中广泛存在,而高温胁迫会引起同工酶类型和活性的变化,且该变化会随着种质的不同而有所差异。本试验所有处理中,耐热型种质‘7036’的 CK 表达了最多的 8 个谱带,在电场作用下其迁移率 Rf 值分别是 0.05、0.28、0.45、0.59、0.63、0.67、0.70、0.74,依次标记为 a、b、c、d、e、f、g、h(图 1),其它处理均缺失 1 条 e 带,表现为种质类型和处理时间的不同引起的 POD 同工酶类型上的差异;在活性较强的共有谱带 d、f、g、h 上,随着高温胁迫时间的延长,耐热型种质‘7036’的 POD 活性经历先下降(1 d)、后迅速恢复(3 d)并逐渐稳定(5 d、7 d)的过程,活性最强出现在 CK,最弱为 T₁ 处理;与耐热型种质‘7036’表现不同的是,热敏型种质‘9050’ POD 同工酶活性初期先迅速升高(1 d),后显著下降(3 d、5 d)并逐渐恢复(7 d),活性最强出现在 T₁ 处理,最弱为 T₅ 处理。总体而言,在 2 种不同热敏性辣椒材料中,未经高温处理时(0 d),耐热型种质‘7036’的 POD 同工酶活性要显著高于热敏

性种质‘9050’,胁迫初期(1 d)在 2 份种质呈现相反的变化趋势,处理的中后期(3~7 d)种质‘7036’的 POD 同工酶活性趋于稳定,而种质‘9050’的 POD 同工酶活性仍呈现剧烈变化(T₅ 处理)。

2.2 辣椒叶片 DNA 质量检测

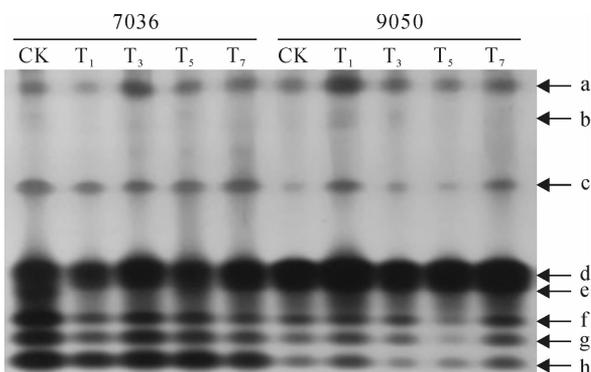
10 个处理的辣椒叶片 DNA 用 0.8% 的琼脂糖检测其浓度和质量,其电泳结果见图 2。提取的 DNA 呈单一条带,无降解现象;进一步用紫外分光光度计检测表明提取的 DNA 纯度较高,将上述处理的 DNA 浓度统一调整到 20 ng/ μ L 用于后续实验。

2.3 高温胁迫对 2 种辣椒甲基化水平的影响

本实验中,运用同裂酶 *Hpa* II、*Msp* I 与 *EcoR* I 的组合对不同处理进行双酶切,尽管同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 都能够识别并切割基因组中的 CCGG 序列,但对于该序列位点出现的胞嘧啶甲基化,两者的反应不同,会产生 3 种不同甲基化类型:类型 I 的两种酶切组合 *EcoR* I-*Hpa* II 和 *EcoR* I-*Msp* I 都有条带,为无甲基化位点;类型 II 的 *EcoR* I-*Hpa* II 有带而 *EcoR* I-*Msp* I 无条带,表明在该位点单链外甲基化,为半甲基化位点;类型 III 的 *EcoR* I-*Hpa* II 无带而 *EcoR* I-*Msp* I 有带,表明在该位点双链内甲基化,为全甲基化位点(图 3)。

为比较高温胁迫下耐热型辣椒‘7036’和热敏型辣椒‘9050’全基因组 DNA 甲基化水平的变化,实验共利用 24 个引物组合对上述不同处理的 DNA 样品进行了 MSAP 分析。由结果(表 2)可知,辣椒‘7036’各处理扩增的总条带数为 294~402,甲基化条带总数为 186~213,总甲基化条带比率为 48%~63.3%;其中的半甲基化条带比率为 19.8%~50.6%,全甲基化条带比率为 12.6%~36.5%;辣椒‘9050’各处理扩增的总条带数为 290~441,甲基化条带总数是 165~252,总甲基化条带比率为 53.5%~60.2%;其中的半甲基化条带比率为 22.3%~26.8%,全甲基化条带比率为 27.8%~34.8%。

进一步比较不同处理与 CK 的 DNA 甲基化水平的差异可知,在辣椒‘7036’中,各处理无甲基化、全甲基化比率都高于 CK,但半甲基化和总甲基化



CK、T₁、T₃、T₅、T₇ 分别为 40 °C 处理(3 h/d) 0、1、3、5、7 d;下同

图 1 高温胁迫后‘7036’和‘9050’POD 同工酶表达

CK, T₁, T₃, T₅, T₇ stand for treatments treated under 40 °C

(3 h/d) for 0, 1, 3, 5, 7 d, respectively; The same as below

Fig. 1 Effect of heat stress on POD expression of pepper ‘7036’ and ‘9050’

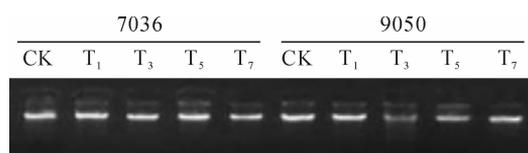
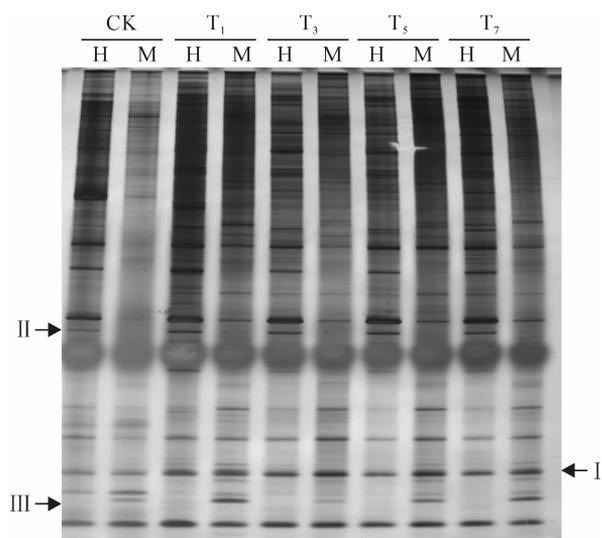


图 2 DNA 质量电泳图片

Fig. 2 DNA electrophoresis map

比率要低;在辣椒‘9050’中,只有 T_7 处理与‘7036’各处理表现类似的变化规律,但其绝对值,尤其是半甲基化和全甲基化比率的数值要远低于辣椒‘7036’,而辣椒‘9050’其它处理的变化则不尽相同。该结果表明,随着热锻炼时间的延长(7 d),热敏型辣椒‘9050’对高温胁迫有了一定的忍受能力,但其耐受性仍然远低于耐热型辣椒‘7036’。



H 和 M 分别表示由引物组合 *EcoR* I -*Hpa* II 和 *EcoR* I -*Msp* I 切割的位点,其中,类型 I 是无甲基化位点,类型 II 为半甲基化位点,类型 III 是全甲基化位点

图 3 引物 E2H2 在辣椒‘7036’中检测的不同组合甲基化类型

Letter H and M indicated the enzyme sites that were cut with *EcoR* I -*Hpa* II and *EcoR* I -*Msp* I, and type I, II, III were sites with non-methylation, half methylation and full-methylation, respectively

Fig. 3 Methylation patterns that were detected by the primer combination E2H2 in pepper ‘7036’

2.4 高温胁迫对 2 种辣椒甲基化模式的影响

根据高温胁迫辣椒基因组所导致的甲基化状态,以 CK 和 T_7 进行对比,在 2 种辣椒中共发现 3 大类 13 种带型。A 类为单态性条带,即 T_7 与 CK 的甲基化位点相同,表明高温胁迫并未引起不同处理间甲基化状态的改变。其中,A1、A2、A3 依次为无甲基化类型、半甲基化类型和全甲基化类型。B 类为超甲基化类型,即与 CK 相比,高温胁迫处理 T_7 会引起甲基化水平增加,增加的类型又细分为 B1、B2、B3、B4、B5 等 5 类;C 类为去甲基化类型,表明高温胁迫处理 T_7 会诱导甲基化水平的降低,降低的类型又细分为 C1、C2、C3、C4、C5 等 5 类。

为检测高温胁迫下辣椒‘7036’和辣椒‘9050’的全基因组 DNA 甲基化模式的变化,利用 24 个引物组合对对照和 T_7 处理的样品进行了 MSAP 分析和比较,结果见表 3 和图 4。在辣椒‘7036’的总条带为 480 时,A、B、C 型条带的数目分别为 164、62 和 254 条,A、B、C 型条带比率分别为 34.2%、13% 和 52.8%;在辣椒‘9050’的总条带为 539 时,A、B、C 型条带的数目分别为 265、177 和 97 条,A、B、C 型条带比率分别为 49.2%、32.8% 和 18%。

上述不同类型条带中,除了 A 型条带为对照和 T_7 无差异性条带外,B 型、C 型均为与高温胁迫相关的 DNA 甲基化多态性带型。比较辣椒‘7036’和辣椒‘9050’在细分类型的不同可知,辣椒‘7036’以 C 型条带居多,表明是以去甲基化为主;而辣椒‘9050’以 B 型条带居多,表明是以超甲基化为主。上述结论表明,在高温胁迫条件下,DNA 去甲基化而不是超甲基化可能是紫色辣椒耐高温胁迫的原因之一。

表 2 2 种辣椒不同处理的 DNA 甲基化水平

Table 2 DNA methylation level of different treatments in two peppers

条带类型 Band type	7036					9050				
	CK	T_1	T_3	T_5	T_7	CK	T_1	T_3	T_5	T_7
I	108	165	189	219	202	189	199	162	124	164
II	149	75	82	88	93	107	110	109	72	80
III	37	138	110	114	107	145	119	136	93	130
甲基化条带总数 Total number of methylation bands	186	213	192	202	200	252	229	245	165	210
扩增条带总数 Total number of bands	294	378	381	421	402	441	428	407	290	374
无甲基化比率 Percentage of non methylation/%	36.7	43.7	49.6	52.0	50.2	42.9	46.5	39.8	42.8	43.9
半甲基化比率 Percentage of half methylation/%	50.6	19.8	21.5	20.9	23.1	24.2	25.7	26.8	24.8	22.3
全甲基化条带比率 Percentage of full-methylation/%	12.6	36.5	28.9	27.1	26.6	32.9	27.8	33.4	32.1	34.8
甲基化条带比率 Percentage of total methylation/%	63.3	56.3	50.4	48.0	50.0	57.1	53.5	60.2	56.9	56.1

表 3 CK 与 T₇ 处理的甲基化状态比较
Table 3 Methylation profiles of T₇ against CK

条带类别 Band pattern	类型 Type	带型 Band type				甲基化模式 Methylation pattern		位点数目 No. of sites		不同类型总条带数(比率) Total number (ratio) of different patterns	
		CK		T ₇		CK	T ₇	7036	9050	7036	9050
		H	M	H*	M*						
单态性条带 Monomorphic band	A1	1	1	1	1	CCGG GGCC	CCGG GGCC	90	172		
	A2	1	0	1	0	^m CCGG GGCC	^m CCGG GGCC	47	35	164(34.2%)	265(49.2%)
	A3	0	1	0	1	C ^m CGG GGC ^m C	C ^m CGG GGC ^m C	27	58		
超甲基化条带 Hypermethylation band	B1	1	1	1	0	CCGG GGCC	^m CCGG GGCC	5	19		
	B2	1	1	0	1	CCGG GGCC	C ^m CGG GGC ^m C	2	28		
	B3	0	1	0	0	C ^m CGG GGC ^m C	^m C CGG GGC ^m C	5	43	62(13.0%)	177(32.8%)
	B4	1	0	0	0	^m CCGG GGCC	^m C CGG GGC ^m C	34	33		
	B5	1	1	0	0	CCGG GGCC	^m C CGG GGC ^m C	16	54		
去甲基化条带 Hypomethylation band	C1	0	1	1	1	C ^m CGG GGC ^m C	CCGG GGCC	13	13		
	C2	1	0	1	1	^m CCGG GGCC	CCGG GGCC	81	24		
	C3	0	0	0	1	^m C CGG GGC ^m C	C ^m CGG GGC ^m C	52	25	254(52.8%)	97(18.0%)
	C4	0	0	1	0	^m C CGG GGC ^m C	^m CCGG GGCC	34	13		
	C5	0	0	1	1	^m C CGG GGC ^m C	CCGG GGCC	74	22		

注:C.无甲基化的胞嘧啶;mC.有甲基化的胞嘧啶;C.甲基化不明确的胞嘧啶。

Note;C. Cytosine without methylation;mC. Cytosine with methylation;C. Cytosine with indefinite methylation.

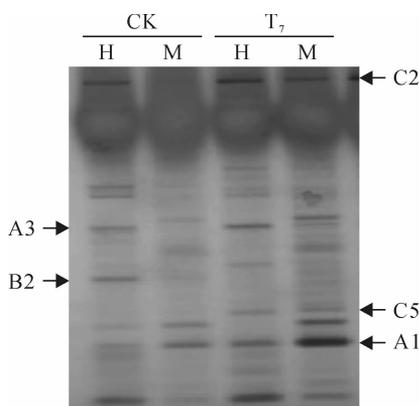


图 4 用引物 E5H4 检测辣椒‘9050’的 CK 与 T₇ 的甲基化状态

Fig. 4 Methylation profiles that were detected in CK and T₇ of pepper ‘9050’ using the primers E5H4

3 讨论

在中国中东部以及沿海地区,每年的 6~8 月份会有连续多天超过 33 °C 以上的高温天气^[17]。此时正值非设施辣椒的开花结果期,辣椒在高温胁迫条

件下会发生一系列的生长障碍,进而导致其‘三落’现象严重、出现大面积的衰老和死亡。因此,亟需育种研究者在筛选耐高温胁迫的辣椒种质的同时,从不同角度分析辣椒耐高温胁迫的机理,以快速发掘抗性种质并予以改良和应用。

目前,有关辣椒应对高温胁迫的生理报道中,姚元干认为辣椒耐热性与电解质外渗率和 MDA 含量呈负相关,与 POD、SOD 活性以及 Pro 含量呈正相关^[18];马宝鹏得出“SOD、POD 活性以及 Pro 和 MDA 含量可作为辣椒耐热鉴定的辅助生理指标,且耐热品系的 SOD 和 POD 活性均显著高于热敏品系”的结论^[9];而何铁光的研究与之有所差异,其研究表明,随着处理时间的延长,SOD 和 POD 活性均表现先下降后上升趋势,其中热敏材料下降幅度高于耐热材料,上升幅度则相反^[10]。本研究中,未经高温处理时(0 d),耐热型种质‘7036’的 POD 同工酶活性要显著高于热敏性种质‘9050’,随着高温胁迫时间的延长,辣椒‘7036’的 POD 同工酶活性经历先下降(1 d)、后迅速恢复(3 d)并逐渐稳定(5 d、7

d)的过程,而热敏型种质‘9050’则在胁迫初期(1 d)和后期(7 d)表现较高的同工酶活性。但总体上,耐热种质的POD活性要高于热敏种质,且具有较强的POD活性恢复能力。因此,综合前人的研究成果以及本研究的结论,以一段时间内(如本例中的7 d)辣椒POD平均活性的强弱作为判断耐热和热敏的指标,可能更具有客观性。

研究表明,植物核基因组中位于CG、CHG和CHH序列(H代表A或T或C碱基)中的胞嘧啶碱基存在甲基化现象,在植物正常生长、细胞分化、基因组印记和染色质失活等过程发挥着重要的作用^[19-23]。目前,高效液相色谱法(HPLC)、亚硫酸氢盐法和甲基敏感扩增多态性(MSAP)技术是3种最常见的检测基因组甲基化的方法,其中以MSAP技术多态性高、引物设计简单、通用性强而得以广泛运用。本试验的24个引物组合除了E4H4外,其余23个组合都扩增出条带,而该引物在棉花、石斛等多种作物中都得以成功运用^[24-26]。本试验中,2种辣椒的基因组CCGG位点的甲基化比率变化范围为50%~63.3%,其中,以耐热型辣椒‘7036’比热敏型辣椒‘9050’变化幅度要宽,该变化是否存在一定的规律性,目前尚无定论^[27]。

此外,植物生长发育过程中会遭遇诸多生物以及非生物胁迫,而基因组胞嘧啶甲基化的变化是植物应付各种不同类型胁迫的防御机制^[28]。DNA甲基化的产生是DNA甲基化酶和去甲基化酶共同作用的结果,高水平的甲基化使基因保持抑制,低水平甲基化则可以增强基因的表达,这可能是由于通过移除诸多不合理位点的甲基化,重新选择DNA位点安置甲基化,从而激活特定基因以应答逆境胁迫^[29-30]。盐胁迫条件下,油菜、棉花中耐盐品系的甲基化位点数多于敏感品系,但去甲基化位点数大于敏感品系^[31-32];在水稻中的研究表明,基因的去甲基化不是随机发生的^[33];温度胁迫中,陈芳等以小麦种子和幼苗为材料进行超低温保存,该材料经低温处理后发生了不同程度的甲基化变化,但去甲基化变化是主要趋势^[34];高贵珍等以油菜种子进行的热胁迫实验表明,耐热品种的去甲基化条带数多于不耐热品种,但甲基化条带数则相反,推测DNA去甲基化可能与植物对热胁迫的适应起到积极作用^[35];生物胁迫中,Le等研究得出缺失3个DNA去甲基化酶rdd的拟南芥突变体WT Col-0易受尖孢镰刀

菌(*Fusarium oxysporum*)的感染,在鉴定的348个基因中有279个活性发生了下调,比率达到80.2%,揭示植物DNA去甲基化与抗性之间的积极关系^[36];病毒侵染会使烟草DNA甲基化水平显著升高,但与抗病性相关的亮氨酸重复序列区域却发生了低甲基化^[37]。本试验比较了耐热型辣椒‘7036’和热敏型辣椒‘9050’在40℃高温胁迫下的甲基化水平变化。其中,辣椒‘7036’中各处理的无甲基化、全甲基化比率升高,而半甲基化和总甲基化比率降低;在辣椒‘9050’中只有T₇处理与‘7036’各处理表现类似的变化规律,但其绝对值,尤其是半甲基化和全甲基化的数值要远低于辣椒‘7036’。该结果表明,随着热锻炼时间的延长(7 d),热敏型辣椒‘9050’对高温胁迫有了一定的忍受能力,但其耐受性仍然远低于耐热型辣椒‘7036’。该结论与徐小万等研究结果中关于“高温胁迫4 d后耐高温辣椒总甲基化率和全甲基化率有所下降、热敏辣椒总甲基化率和全甲基化率有所上升”存在差异^[38]。其差异的原因除了所用材料的不同外,本实验结论是基于材料7 d的连续处理结果,且所用引物也更多。在甲基化模式变化上,辣椒‘7036’以C型条带居多,表明是以去甲基化为主;而辣椒‘9050’以B型条带居多,是以超甲基化为主。该结论与前人诸多的研究结论较为一致,即去甲基化可能积极参与紫色辣椒耐高温胁迫。

综上所述,本研究探讨了40℃高温胁迫对耐热型晚熟紫色辣椒‘7036’和热敏型早熟绿色辣椒‘9050’的POD同工酶以及DNA甲基化表达的影响。结果表明,同工酶类型和活性在不同种质以及不同处理阶段存在差异,未经高温胁迫的耐热型辣椒‘7036’比其它处理多了1条Rf值为0.63的e带,而在胁迫条件下其POD同工酶恢复能力要显著高于热敏型辣椒‘9050’;随着高温胁迫时间的延长,辣椒‘7036’的无甲基化和全甲基化比率增加,半甲基化和总甲基化比率降低,而辣椒‘9050’只有T₇处理的甲基化水平变化与之类似,但半甲基化和全甲基化的绝对值要远低于辣椒‘7036’;甲基化模式分析表明辣椒‘7036’去甲基化C型条带比率较高,而辣椒‘9050’则以超甲基化B型条带为主。上述结论中,POD同工酶活性的恢复,半甲基化水平的大幅下降和全甲基化水平的快速上升以及去甲基化可能与紫色辣椒耐高温胁迫相关。

参考文献:

- [1] 徐小万,雷建军,李颖,等.基于数学模型的辣椒芽期耐高温多湿性综合评价方法[J].中国农业科技导报,2013,6:174-180.
XU X W, LEI J J, LI Y, *et al.* Comprehensive evaluation of high temperature and humidity tolerance of hot pepper at germination stage bases on mathematical model[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 6:174-180.
- [2] 高亮之,金之庆.全球气候变化和中国的农业[J].江苏农业学报,1994,2:1-10.
GAO L Z, JIN Z Q. Global climate change and China's agriculture[J]. *Jiangsu Academy of Agricultural Sciences*, 1994, 2: 1-10.
- [3] 胡能兵.紫色辣椒再生体系的建立及种质亲缘关系分析[D].合肥:安徽农业大学,2008.
- [4] 马宝鹏.辣椒耐热性鉴定体系的建立及高温胁迫下花药基因表达差异的研究[D].陕西杨陵:西北农林科技大学,2013.
- [5] 邹学校.中国辣椒[M].北京:中国农业出版社,2002:10-22.
- [6] PAGAMAS P, NAWATE E. Sensitive stages of fruit and seed development of chili pepper (*Capsicum annum* L. var. Shishito) exposed to high-temperature stress[J]. *Scientia Horticulturae*, 2008, 117(1):21-25.
- [7] 潘宝贵.高温胁迫对辣椒苗期光合作用和抗氧化系统的影响[D].江苏扬州:扬州大学,2005.
- [8] 徐小万,雷建军,罗少波,等.高温高湿对不同品种(系)现蕾期辣椒 (*Capsicum annum* L.) 抗氧化性的影响[J].核农学报,2010,2:394-400.
XU X W, LEI J J, LUO S B, *et al.* Effect of high temperature and air humidity stress on antioxidant activity differences of hot pepper varieties at budding stage[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2010, 2:394-400.
- [9] 马宝鹏,逯明辉,巩振辉.辣椒幼苗对高温胁迫的生长生理响应[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2013,10:112-118.
MA B P, LU M H, GONG Z H. Responses of growth and physiology of pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings to heat stress[J]. *Journal of Northwest A&F University (Nat. Sci. Edi.)*, 2013, 10:112-118.
- [10] 何铁光,董文斌,王爱勤,等.高温胁迫下辣椒生理生化响应机理初步探讨[J].西南农业学报,2013,2:541-544.
HE T G, DONG W B, WANG A Q, *et al.* Studies on physiological and biochemical response mechanism to heat stress in pepper seedlings with different heat tolerance[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 2:541-544.
- [11] 隋益虎.辣椒紫色性状遗传分析、相关基因克隆和种间杂种创制[D].南京:南京农业大学,2011.
- [12] 胡能兵,隋益虎,张子学,等.紫色辣椒色素性状观察及其叶片色素提取体系优化[J].西北植物学报,2012,12:2 450-2 456.
HU N B, SUI Y H, ZHANG Z X, *et al.* Observation of pigment in purple pepper and extraction system optimization of leaf purple pigment[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.*, 2012, 32(12):2 450-2 456.
- [13] 滕有德,徐向上,陈学群.川西南辣椒种质资源[J].中国蔬菜,1997,3:29-32.
- [14] 胡能兵,崔广荣,张子学,等.谷氨酰胺、氯化镧对石斛兰离体增殖及叶片 POD、CAT 同工酶表达的影响[J].稀土,2011,1:90-95.
HU N B, CUI G R, ZHANG Z X, *et al.* Effects of lutamine, lanthanum chloride on proliferation of *Dendrobium in vitro* and POD, CAT isozyme expression of leaves[J]. *Chinese Rare Earths*, 2011, 1:90-95.
- [15] REYNA-LÓPEZ G E, SIMPSON J, RUIZ-HERRERA J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms[J]. *Molecular and General Genetics*, 1997, 253:703-710.
- [16] BASSAM B J, CAETANO-ANOLLES G, GRESSHOFF P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 196:80-83.
- [17] 徐小万,雷建军,罗少波,等.辣椒苗期耐热耐湿鉴定方法的研究[J].核农学报,2009,5:884-890.
XU X W, LEI J J, LUO S B, *et al.* Identification of hot pepper (*Capsicum annum* L.) seedling for high temperature and air humidity resistance [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2009, 05:884-890.
- [18] 姚元干,石雪晖,杨建国,等.辣椒耐热性与叶片质膜透性及几种生化物质含量的关系[J].湖南农业大学学报,2000,2:97-99.
YAO Y G, SHI X H, YANG J G, *et al.* Relations of the permeability of plasma membrane of leaves and the contents of several biochemical matter to heat-tolerance of pepper[J]. *Journal of Hunan Agricultural University*, 2000, 2:97-99.
- [19] XIONG L Z, XU C G, SAGHAI M A, *et al.* Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique[J]. *Molecular and General Genetics*, 1999, 261:439-446.
- [20] BARANEK M, KRIZAN B, ONDRUSIKOVA E, *et al.* DNA-methylation changes in grapevine somaclones following in vitro culture and thermotherapy[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2010, 101:11-22.
- [21] SUZIKI M M, BIRD A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9:464-476.
- [22] ZHANG M S, KIMATU J N, XU K Z, *et al.* DNA cytosine methylation in plant development[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2010, 37, 1-12.

- [23] PORTIS E, ACQUADRO A, COMINO C, *et al.* Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J]. *Plant Science*, 2004, 166: 169-178.
- [24] 关 蕾, 樊洪泓, 陈沙沙, 等. 强光下 H₂S 对石斛 DNA 甲基化及抗氧化系统的影响[J]. 核农学报, 2013, 8: 1 090-1 098.
GUAN L, FAN H H, CHEN S S, *et al.* Effect of sodium hydrosulfide on DNA methylation and antioxidant system of *Dendrobium officinale* under high light stress[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2013, 8: 1 090-1 098.
- [25] 郭 宁, 席晓广, 张晓旭, 等. 乙烯利处理对棉花子叶 DNA 表观遗传变化的甲基化敏感扩增多态性(MSAP)分析[J]. 农业生物技术学报, 2014, 9: 1 131-1 140.
GUO N, XI X G, ZHANG X X, *et al.* Methylation sensitive amplified polymorphism(MSAP) analysis of DNA epigenetic changes of cotton(*Gossypium hirsutum* L.) cotyledons under ethephon treatment[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 9: 1 131-1 140.
- [26] FAN H H, LI T C, GUAN L, *et al.* Effects of exogenous nitric oxide on antioxidation and DNA methylation of *Dendrobium huoshanense* grown under drought stress[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2012, 109: 307-314.
- [27] 潘雅姣, 傅彬英, 王 迪, 等. 水稻干旱胁迫诱导 DNA 甲基化时空变化特征分析[J]. 中国农业科学, 2009, 9: 3 009-3 018.
PAN Y J, FU B Y, WANG D, *et al.* Spatial and temporal profiling of DNA methylation induced by drought stress in rice [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 9: 3 009-3 018.
- [28] 李青芝, 李成伟, 杨同文. DNA 甲基化介导的植物逆境应答和胁迫记忆[J]. 植物生理学报, 2014, 50(6): 725-734.
LI Q Z, LI C W, YANG T W. Stress response and memory mediated by DNA methylation in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50(6): 725-734.
- [29] FINNEGAN E J, GENDER R K, KOVAC K, *et al.* DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95: 5 824-5 829.
- [30] KUMAR S, KUMARI R, SHARMA V, *et al.* Roles, and establishment, maintenance and erasing of the epigenetic cytosine methylation marks in plants[J]. *Journal of Genetics*, 2013, 92(3): 629-666.
- [31] MARONI G, PACE R, TRAINI A, *et al.* Use of MSAP markers to analyse the effects of salt stress on DNA methylation in rapeseed(*Brassica napus* var. *oleifera*) [J]. *PloS One*, 2013, 8(9): e75597.
- [32] ZHAO Y L, YU S X, YE W W, *et al.* Study on DNA cytosine methylation of cotton(*Gossypium hirsutum* L.) genome and its implication for salt stress tolerance[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2010, 9(6): 783-791.
- [33] WANG W, ZHAO X, PAN Y, *et al.* DNA methylation changes detected by methylation-sensitive amplified polymorphism in two contrasting rice genotypes under salt stress[J]. *Journal of Genetics and Genomic*, 2011, 38(9): 419-424.
- [34] 陈 芳, 王子成, 何艳霞, 等. 超低温保存小麦种子和幼苗的遗传变异分析[J]. 核农学报, 2009, 4: 548-554, 638.
CHEN F, WANG Z C, HE Y X, *et al.* Analysis of genetic variation of wheat seeds and seedlings caused by ultra-low-temperature preservation[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2009, 23(4): 548-554, 638.
- [35] 高桂珍, 应 菲, 陈碧云, 等. 热胁迫过程中白菜型油菜种子 DNA 的甲基化[J]. 作物学报, 2011, 37(9): 1 597-1 604.
GAO G Z, YING F, CHEN B Y, *et al.* DNA methylation of seed in response to heat stress in *Brassica rapa* L. [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2011, 37(9): 1 597-1 604.
- [36] LE T, SCHUMANN U, SMITH N A, *et al.* DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in *Arabidopsis* [J]. *Genome Biology*, 2014, 15: 458.
- [37] BOYKO A, KATHIRIA P, ZENP F J, *et al.* Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(5): 1 714-1 725.
- [38] 徐小万, 雷建军, 张长远, 等. 高温多湿胁迫下辣椒 DNA 甲基化分析[J]. 核农学报, 2014, 7: 1 175-1 180.
XU X W, LEI J J, ZHANG C Y, *et al.* Methylation-sensitive amplified polymorphism analysis of DNA methylation in hot pepper under high temperature and air humidity stress[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 7: 1 175-1 180.

(编辑: 宋亚珍)